

CN 1357⁰ 43A

AVIRULENT XANTHOMONAS-CAMPESTRIS STRAINS PRODUCING XANTHAN

The invention concerns a bacterial strain which has lost its phytopathogenic character by inactivation of at least one virulence gene and preserved its capacity for producing exopolysaccharide.

2

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/31

C12P 19/06 C07K 14/21

C12N 1/21

//(C12N1/21, C12R

1: 64)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00809327. X

[43] 公开日 2002 年 7 月 3 日

[11] 公开号 CN 1357043A

[22] 申请日 2000.6.21 [21] 申请号 00809327. X

[30] 优先权

[32] 1999.6.22 [33] FR [31] 99/07963

[86] 国际申请 PCT/FR00/01725 2000.6.21

[87] 国际公布 WO00/78967 法 2000.12.28

[85] 进入国家阶段日期 2001.12.21

[71] 申请人 罗狄亚化学公司

地址 法国布洛涅-比扬古

[72] 发明人 J·皮尔拉德 J-L·西蒙

P·切瓦勒里奥

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 产生黄原胶的无毒力野油菜黄单胞菌菌株

[57] 摘要

本发明涉及通过失活至少一个毒力基因而丧失致植物病性质的细菌菌株,它保持着产生外多糖的能力。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 细菌菌株，其已通过失活至少一个毒力基因而丧失致植物病性质，并保留产生外多糖的能力。
2. 权利要求 1 所要求保护的细菌菌株，其特征在于已通过失活 *hrp* 或 *hrc* 基因群的至少一个基因，有利的是至少两个基因，优选至少三个基因使其成为稳定地非致植物病的细菌菌株。
3. 权利要求 1 或 2 所要求保护的细菌菌株，其特征在于已通过失活 *hrp* 或 *hrc* 基因群的 5 至 9 个基因使其成为稳定地非致植物病的细菌菌株。
4. 权利要求 1 所要求保护的细菌菌株，其特征在于它是通过失活至少一个毒力基因而丧失致植物病性质但保留产生外多糖能力的黄单胞菌属菌株。
5. 权利要求 4 所要求保护的黄单胞菌属菌株，其特征在于它是野油菜黄单胞菌的菌株。
6. 权利要求 5 所要求保护的黄单胞菌属菌株，其特征在于它是野油菜黄单胞菌野油菜致病变种。
7. 以上任一个权利要求所要求保护的黄单胞菌属菌株，其特征在于通过缺失 *hrp* 或 *hrc* 基因群中至少 1kb，优选至少 3kb，有利的是至少 5kb 的 DNA 区来获得所述基因的失活，并且该菌株保持产生外多糖的能力。
8. 以上任一个权利所述要求所要求保护的黄单胞菌属菌株，其特征在于它包含了至多 40 kb 的 DNA 区的缺失。
9. 权利要求 8 所要求保护的黄单胞菌属菌株，其特征在于其是通过缺失 *hrpA1* 到 *hrpC2* 基因的全部或部分来获得的。
10. 本质上非致植物病的黄单胞菌属菌株，其特征在于它包含 *hrp* 或 *hrc* 基因群中至少 1kb，优选至少 3kb，有利的是至少 5kb 的 DNA 区域的缺失，并且它保留了产生外多糖的能力。
11. 本质上非致植物病的黄单胞菌属菌株，其特征在于它是通过 *hrpA1-C2* 基因的全部或部分缺失来获得的。
12. 本质上非致植物病的野油菜黄单胞菌菌株，其选自 BICCAT 1016、

BIOCAT 1017、BIOCAT 1019、BIOCAT 1021 和 BIOCAT 1022 菌株，其中这些菌株分别以编号 CBS 101940、CBS 101941、CBS 101942、CBS 101943 和 CBS 101944 保藏在 CBS。

13. 权利要求 4 到 13 的任一个所要求保护的黄单胞菌属菌株，其特征在于外多糖是黄原胶。

14. pRPA-BCAT 质粒，用于产生权利要求 9 到 13 所要求保护的菌株。

15. 制备权利要求 7 到 13 之任一个所要求保护的菌株的方法，其特征在于通过与含有 *hrp* 或 *hrc* 基因的全部或部分缺失的质粒进行同源重组来获得该菌株。

16. 制备细菌外多糖，尤其是黄原胶的方法，其特征在于将权利要求 1 到 13 之任一个所要求保护的细菌菌株，适当地，黄单胞菌属的细菌菌株，优选野油菜黄单胞菌的细菌菌株，在允许于发酵培养基中产生外多糖的条件下进行培养。

17. 一种核酸，其特征在于它包含核苷酸序列 SEQ ID No. 3.

18. 一种核酸，其特征在于它包含核苷酸序列 SEQ ID No. 6.

19. 一种核酸，其特征在于它包含核苷酸序列 SEQ ID No. 7.

说明书

产生黄原胶的无毒力野油菜黄单胞菌菌株

本发明涉及丧失了致植物病性质但基本上保持了产生外多糖(exopolysaccharide),尤其是黄原胶能力的新型细菌菌株,特别是黄单胞菌属(*Xanthomonas*)的菌株,尤其是野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)。

野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*X. campestris* pv. *campestris*)是十字花科植物的致植物病的革兰氏阴性细菌,它用于黄原胶的工业生产(Martin, 1994, 微生物学研究(Res. Microbiol.) 145: 9 93-97)。

这种外多糖经济上的重要性引起了许多关于参与此合成的基因的研究(Martin, 1994, 如上所述)。

已经对致病性的许多决定因素作了描述(Dow 和 Daniels, 1994, 植物与动物中的细菌致病原因(In bacterial pathogenesis of plants and animals), J.L. Dangl 编, Springer Verlag, Heidelberg)。其中有对植物组织具有水解活性的胞外酶。当负责这些酶输出的分泌系统失活时,野油菜黄单胞菌的菌株就失去了其致植物病的表型,而此与植物中非常减弱的症状有关(Dow 和 Daniels, 1994, 如上所述)。所描述的致病性决定因素中,外多糖似乎在疾病的早期显示出作用(Dow 和 Daniels, 1994, 如上所述; Katzen 等人, 1998, 细菌学杂志(J. Bacteriol.) 180: 1607-1617)。同样地,野油菜黄单胞菌野油菜致病变种中描述的 *hrpXc* 基因(Kamoun 等人, 分子植物微生物相互作用(Mol. Plant Microbe Interact) 5: 22-33)参与抑制相容宿主植物的防御反应,因为这个基因的突变会导致特征性的坏死反应(过敏性反应, HR)。多种野油菜黄单胞菌致病变种中所描述的无毒力基因也参与细菌的致病性,因为含有对应于和引起 HR 反应的抗性基因的植物能够识别它们(Dow 和 Daniels, 1994, 如上所述; Yang 等人, 1995, 分子植物微生物相互作用 8: 627-631)。在参与黄单胞菌属致病性的其它基因中(Dow 和 Daniels, 1994,

如上所述), 已经描述了野油菜黄单胞菌野油菜致病变种中的两个基因, 它们的突变将引起其致病性的减弱, 并且没有改变胞外酶和外多糖的累积水平 (Osbourn 等人, 1990, 分子植物微生物相互作用 3: 280-285)。其它致病性决定因素包括多组调节胞外酶和外多糖合成的独立基因, 其中有: *rpfA* 至 *H* 基因, 它们的突变引起外多糖产生的降低; *rpfN* 基因, 是这些酶和外多糖合成的阻遏基因 (repressor); *clp* 基因, 它的突变引起致病性的下降以及外多糖产物的降低 (Dow 和 Daniels, 1994, 如上所述)。最后, 致病性的其它决定因素包括 *hrp* 基因。

hrp (过敏性反应和致病性) 基因对与相容植物有关的致病性和与抗性宿主有关的过敏性反应是至关重要的 (Alfano 和 Collmer, 1997, 细菌学杂志 179: 5655-5662)。在欧文氏菌属、假单胞菌属、*Ralstonia* 属和黄单胞菌属的多种致植物病的细菌中, 已经克隆了这些基因, 并在不同程度上描绘了其特性, 它们是相对保守的 (Zurek 和 Bukowski, 1998, *Acta Microbiologica Polonica*, 47: 227-241; Alfano 和 Collmer, 如上所述), 尤其是在野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) 中 (Huguet 等人, 1998, 分子微生物学 (*Molec. Microbiol.*) 29: 1379-1390; Fenselau 等人, 1992, 分子植物微生物相互作用, 5: 390-396; Bonas, 1994, 如上所述)。而且已经将其中最保守的改名为 *hrc* 基因 (Bogdanove 等人, 1996, 分子微生物学, 20: 681-683)。迄今为止所描述的 *hrp* 基因的功能中有它们的表达调控、引起宿主反应的蛋白质的产生、特异的分泌系统 (“III 型”) 的组成以及周质葡聚糖的合成 (Zurek et Bukowski, 1998, *Acta Microbiologica Polonica*, 47: 227-241; Mudgett et Staskawicz, 1998, 微生物学的当前观点 (*Current Opinion in Microbiology*) 1: 109-114; Lindgren, 1997, 植物病原学年评 (*Annu. Rev. Phytopathol.*) 35: 129-152; Alfano 和 Collmer, 1997, 如上所述; Bonas, 1994, 如上所述)。已经克隆了一组野油菜黄单胞菌野油菜致病变种中的 *hrp* 基因 (Arlat 等人, 1991, 分子植物微生物相互作用, 4: 593-601), 但是没有测序。也已经报道, 根据平板上菌落的外观, 认为由转座子引起这些基因发生突变的菌株具

有正常外多糖的产生。但是没有公布这些菌株中更为精确定量的黄原胶产生能力。

另外，这些菌株中产生的突变在性质上不十分稳定，不适用于生产黄原胶的工业用途。具体地，所使用的转座子含有编码转座酶的基因（Simon 等人，1989，基因（Gene） 80: 161-169），不排除估计大约以每世代 10^{-6} 至 10^{-3} 的频率发生转座子的切除事件（Berg 等人，1989，Berg 和 Howe 编著，可移动 DNA (Mobile DNA)，美国微生物学会，华盛顿，879-926 页；Craig，大肠杆菌和沙门氏菌 (*Escherichia coli* and *Salmonella*)，Neidhardt 编著，ASM 出版社，华盛顿，2339-2362 页）。另外，所使用的转座子含有抗生素新霉素和卡那霉素的抗性基因。最后，插入到这些菌株基因组中的转座子构成非同源性 DNA 元件，因为它不是该菌株基因组自身的元件。

虽然，目前在欧洲没有因野油菜黄单胞菌野油菜致病变种的致植物病性质而施加特殊的管理法规，但是由于与环境有关的原因，使用非致植物病的野油菜黄单胞菌来降低可能污染附近农学目的栽培的风险是非常可取的。使用常规的随机诱变技术来选择用于生产的这样的菌株是一个冗长乏味的过程，因为它必须包括分离非致植物病但又保持生产能力特性（即无次级突变）的菌株的高通量筛选。

此外，使用产生改造的黄原胶（如 US 5,514,791 所描述的）或者已经提高了生产力的遗传修饰菌株是经过严格规定的（Theilleux 1998, Dictionnaire permanent bioéthique et biotechnologies [生物伦理学和生物技术的永久条例], ed Législatives [立法机关编], 第 1595-1648 页）。后者要求，尤其是对菌株中产生的对植物有危害的结构，在生产地区必须采用严格的防止扩散措施。因此，必要花费将具有负面的经济后果。

因此，要求用于工业生产的野油菜黄单胞菌菌株稳定地缺失致植物病性质，但保留其黄原胶的生产能力特性。另外，由于法规以及为了简化由生物质中分离黄原胶所带来的垃圾处理，使用不含有编码抗生素抗性的异源基因的菌株是有用的。最后，根据法国和欧洲立法，优选使用

通过自体克隆 (autoclone) 构建得到的菌株, 即是它不含有自身遗传以外的任何 DNA 元件。

本发明人的研究已经可以构建具有所要求特性的野油菜黄单胞菌菌株。

令人惊讶的是, 本发明显示, 通过缺失影响到毒力有关基因的几千个碱基的相当大的片段, 得到稳定地非致植物病的细菌, 但是它仍然能够生产黄原胶。

更为令人惊讶的是, 本发明所改造的菌株产生的黄原胶在数量和质量的所有方面都能够与产生该结构的野生型菌株所产生的黄原胶相比。

本发明的一个主题是通过失活至少一个毒力基因而丧失致植物病性质, 并且保持产生外多糖能力的细菌菌株。

根据本发明, 通过缺失 *hrp* 或 *hrc* 基因群的至少一个基因, 有利的是至少两个基因, 优选至少三个基因, 优选 *hrp* 或 *hrc* 基因群的 5 至 9 个基因, 可有利地获得稳定地非致植物病的细菌菌株。

措辞“稳定地缺乏致植物病性质”是指在经过至少 20 代, 有利的是至少 30 代, 优选至少 40 代的细胞周期以后仍然保留着这个特性。

在丧失了致植物病性质并能够有利地用于外多糖工业生产的细菌中, 尤其要提到以下属: 欧文氏菌属 (*Erwinia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、*Ralstonia* 以及黄单胞菌属。

本发明的一个主题, 尤其是本质上稳定地缺乏致植物病性质并且基本保持产生外多糖能力的黄单胞菌属菌株。

措辞“本质上非致植物病的”是指在通过损害叶片的中脉进行接种至少 15 天后, 在宿主十字花科植物, 尤其是甘蓝 (*Brassica oleracea*) 的叶上没有扩散损伤和/或枯萎。

有利地, 黄单胞菌属菌株是野油菜黄单胞菌的, 尤其是野油菜致病变种的。

所述基因的失活优选通过缺失 *hrp* 或 *hrc* 基因群中至少 1kb, 优选至少 3kb, 有利地至少 5kb, 优选 *hrp* 或 *hrc* 基因群中的 9kb, 并可长达 40kb 来获得。

在一个优选的实施方案中，通过缺失野油菜黄单胞菌野油菜致病变种致植物病的野生型菌株的 *hrpA1* 至 *hrpC2* 基因得到根据本发明的本质上非致植物病的黄单胞菌属菌株，尤其是野油菜黄单胞菌菌株。

本发明黄单胞菌属菌株所产生的黄原胶与野生型产生的是基本相同的，换句话说，它具有基本相同的分子量分布，还有相同程度的修饰，尤其是乙酰化和丙酰化 (pyruvylation) 的程度。

本发明的主题还有一种制备以上所定义菌株的方法，其特征在于是通过与含有 *hrp* 或 *hrc* 基因的全部或部分缺失的质粒进行同源重组来获得的。

本发明的主题还有一种制备细菌外多糖，尤其是黄原胶的方法，其特征在于将以上所定义的细菌菌株，适当地，黄单胞菌属菌株，优选野油菜黄单胞菌菌株，在允许于发酵培养基中产生外多糖的条件下进行培养。

下面的实施例将举例说明对应于本发明特征的野油菜黄单胞菌菌株的构建。

在这些实施例中，使用通过筛选黄原胶所获得的野油菜黄单胞菌野油菜致病变种菌株来进行构建。

不用说，根据所述技术领域中的一般知识以及以下所给出的说明，尤其是当菌株属于野油菜黄单胞菌时参考部分所报道的序列，黄单胞菌属和不同属中产生外多糖的、本领域技术人员可获得的其它细菌菌株也可用作产生非致植物病菌株的出发原始材料，

为理解实施例，将参考附图，其中：

-图 1 用图解法表示构建携带 *hrp* 基因缺失的野油菜黄单胞菌 RPA-BIOCAT826 菌株衍生物的策略。

Fenselau 和 Bonas(1995, 分子植物微生物相互作用, 8(6): 845-854) 和 Fenselau 等人, (1992, 分子植物微生物相互作用, 5: 390-396) 描述了野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种中 *hrp* 基因的组成, 在 Genebank 中是可部分获得, 其登录号为 U33548。按照克隆它们的质粒的名称, 对从 RPA-BIOCAT826 菌株中克隆的同源区进行了描述。Arlat 等人(分

子植物微生物相互作用, 1991, 4: 593-601) 公布了野油菜黄单胞菌野油菜致病变种中 *hrp* 区的限制性图谱, 并在实施例 1 到 4 中给出了所完成的结果。经过双重同源重组将实施例中所描述的 pRPA-BCAT140 质粒携带的 $\Delta hrpA1-C2$ 缺失引入到基因组中。

-图 2 表示使用以下所描述的 HRPB5 探针和 RPA-BIICAT826 菌株以及该菌株的两个已经整合了 $\Delta hrpA1-C2$ 缺失的衍生物的基因组 DNA, 通过 DNA 印迹法所得到的杂交信号。分子量大小标记条带的位置是通过与转移以前经溴化乙锭染色的凝胶上的移动距离比较而得到的。这些大小用千碱基(kb)来表示。

-图 3 表示使用以下所描述的 HRPC2 探针和 RPA-BIICAT826 菌株以及该菌株的五个已经整合了 $\Delta hrpA1-C2$ 缺失的衍生物的基因组 DNA, 通过 DNA 印迹法所得到的杂交信号。分子量大小标记条带的位置是通过转移以前经溴化乙锭染色的凝胶上的移动距离比较而得到的。这些大小用 kb 来表示。

材料和方法

除非另外说明, 所使用的技术都是本领域技术人员所公知的常规分子生物学和微生物学的技术, 例如 Ausubel 等人 1987 年 (分子生物学当代方法 (Current Protocol in Molecular Biology), John Wiley and Sons, 纽约; Maniatis 等人, 1982, 分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning: a laboratory manual), 冷泉港实验室, 纽约) 和 Coligan 等人 1997 年 (蛋白质科学当代方法 (Current Protocol in Protein Science) John Wiley & Sons 公司) 所描述的。

1. 原始菌株

RPA-BIICAT826 菌株来自 Rhodia Chimie 的保藏中心 (Melle factory, RTAM), 根据它的白色形态外观而不是通常的黄色外观来加以选择。RPA-BIICAT1016、1017、1019 和 1021 菌株保藏在 CBS, 各自的编号为 CBS 101940、CBS 101941、CBS 101942、CBS 101943 和 CBS 101944。

2. MSX 培养基

培养黄单胞菌属的 MSX 培养基含有: 0.2g/l 酵母提取物; 1.2g/l

NH_4NO_3 ; 7.3g/l K_2HPO_4 ; 0.25g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g/l 葡萄糖和 15g/l 细菌用琼脂 (Bacto-Agar) 用于琼脂培养基; 10g/l 葡萄糖用于液体培养基。将硫酸镁和葡萄糖分别灭菌并临时加入。灭菌之前, 用稀释到 10% 的硫酸将培养基的 pH 平衡到 pH7.2。

基因组 DNA 是由 MSX 中新鲜的液体培养物制备的 (OD_{660} 小于 0.4)。将 40ml 培养物离心后, 用 11.9ml TE 缓冲液悬浮细胞沉淀 (分子生物学当代方法, John Wiley and Sons, 纽约), 加入 $630 \mu\text{l}$ 10% SDS (十二烷基硫酸钠), 然后再加入 $63 \mu\text{l}$ 20mg/ml 的蛋白酶 K。37℃ 孵育 1 小时后, 加入 2.1ml 5M 的 NaCl 溶液, 然后加入 1.7ml 溶解于 0.7M NaCl 溶液中的 10% CTAB, 将整个混合物在 65℃ 孵育 10 分钟。用等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1) 混合物第一次抽提后, 再用等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 混合物进行第二次抽提, 将上清中加入 0.6 体积的异丙醇。离心 (10 000 转/分 5 分钟) 后, 将得到的沉淀用 70% 的乙醇洗涤后干燥, 再溶解到至少 2ml 的 TE 中, 然后再加入 $25 \mu\text{l}$ 5mg/ml 的核糖核酸酶溶液。37℃ 孵育 1 小时后, 用酚/氯仿/异戊醇进行抽提, 通过加入 0.1 体积的 3M 醋酸钠和 2.5 体积的乙醇将上清中的 DNA 沉淀出来。将 14 000 转/分离心 5 分钟得到的沉淀用 70% 的乙醇洗涤, 干燥后, 重新悬浮在至少 0.5ml 的 TE 中。

实施例 1

RPA-BIOCAT826 的 hrpC2 区的克隆

使用引物 XcC2.3 (SEQ ID No. 1) 和 XcC2.4 (SEQ ID No. 2) 从 RPA-BIOCAT826 的基因组 DNA 起始通过 PCR 扩增目的片段。抽提 RPA-BIOCAT826 菌株的基因组 DNA, 并在 PCR 反应中使用, 其中含有 100ng 基因组 DNA, 40pmol 的每一种引物, 0.2mM dNTP 和 1.25U Pwo 聚合酶 (Boehringer Mannheim), 终体积为 $50 \mu\text{l}$ 这种酶的缓冲液。95℃ 孵育 5 分钟后, 混合物首先经过 30 个循环, 每个循环包括 94℃ 孵育 1 分钟, 然后在温度 63℃-48℃ (每一循环变化 0.5℃) 下 1 分钟, 以及 72℃ 1 分钟。接下来的 15 个循环包括 94℃ 孵育 1 分钟, 48℃ 1 分钟以及 72℃ 1 分钟。最后是 72℃ 10 分钟。将大小接近 1.2kb 的扩增产物通过在琼脂糖凝胶上的移动和

接下来使用的 Qiaex 试剂盒 (Quiagen) 来进行纯化。然后将它克隆到用 EcoRV 打开的 pZERO-1 载体 (Invitrogen BV) 中。转化大肠杆菌 (E. coli) 菌株 JM110 后, 选择含有已经整合了 1.2kb 片段的质粒的克隆。将这个质粒命名为 pRPA-BCAT91 并将它所含有的插入片段进行测序 (Genome Express, Grenoble, 法国)。将所得到的序列 (SEQ ID No. 3) 与野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种的 hrpC2 基因序列 (Fenselau 等人, 1992, 分子植物微生物相互作用, 5: 390-396) 进行对比。与代表 61% hrpC2 基因的 1188bp 的序列有 87% 的一致性。由核苷酸序列所推测的氨基酸序列与野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种的 HrpC2 蛋白序列的相应部分显示出 92% 的一致百分比。

实施例 2

RPA-BIOCAT826 HrpA 区的克隆

使用对应于野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种菌株等同区域的探针, 通过筛选 RPA-BIOCAT826 菌株的部分基因组文库来克隆该区。在名为 pL3o 的质粒中可得到该区域, 该质粒含有包括野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种的 hrpB8 和 hrpA1 基因 6.6kb 的 EcoRV 插入片段 (Fenselau 等人, 1992, 分子植物微生物相互作用, 5: 390-396)。

使用引物 XcvA15 (SEQ ID No. 4) 和 XcvA18 (SEQ ID No. 5) 各 40pmol, pL3o 质粒模板 (40ng), 0.2mM dNTP 和 1.25U Pwo 聚合酶 (Boehringer Mannheim), 终体积为 50 μ l 的这种酶的缓冲液, 通过 PCR 来制备 HRP A1 探针。95 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟后, 混合物经过 30 个循环, 各循环包括 94 $^{\circ}$ C 孵育 30 秒钟, 然后在 55 $^{\circ}$ C 下 1 分钟, 以及 72 $^{\circ}$ C 1.5 分钟。最后 72 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟后, 将扩增的 664bp 产物先在琼脂糖凝胶上, 然后再使用 Qiaex 试剂盒 (Quiagen) 进行纯化。

用 100 单位的 EcoRI 将大约 10 μ g 的 BIOCAT826 菌株基因组 DNA 在 37 $^{\circ}$ C 消化 16 小时。然后使用常规的 DNA 印迹技术, 目的是测定与上述的 HRP A1 探针杂交的 EcoRI 片段的大小。将上述的 EcoRI 消化物在琼脂糖凝胶上移动后, 转移到 Hybond N+膜 (Amersham) 上, 使用按照制造商的说明用 Ready-To-Go 试剂盒 (Pharmacia Biotech) 得到的磷 32 标记的 HRP A1

探针, 在水性杂交溶液 (0.55% SDS; 6% SSC; 0.25% 脱脂奶粉) 中, 55℃ 进行杂交 19 小时, 并用 0.2 SSC 和 0.1% SDS 溶液在 55℃ 下洗涤, 将膜在 -80℃ 下放射自显影 19 小时。胶片的显影表明杂交信号的大小接近 7.3kb。

因此, 用 1000 单位的 EcoRI 将 100 μg 的 RPA BIOC826 菌株基因组 DNA 在 37℃ 消化 20 小时后, 产生该菌株的部分基因组文库。在琼脂糖凝胶上移动后, 将大小在 7kb 到 8kb 片段所对应的区域切下, 在透析袋 (购自 Spectrum Medical Industries 公司的 Spectra/Por 膜) 中通过电洗脱将 DNA 从胶中抽提出来。乙醇沉淀后, 将 DNA 与经 EcoRI 酶切后用虾碱性磷酸酶 (美国生物化学 (United States Biochemicals)) 去磷酸化的 pBlueScript II SK 载体 (Stratagene) 在终体积 10 μl 中连接。将连接化合物在 16℃ 孵育 14 小时后, 用 1/10 的混合物通过电穿孔转化大肠杆菌 DH5α 细胞。使用 HRPAl 探针与转移到尼龙膜上的菌落进行杂交来分析大约 3 000 个转化体。将 12 个产生阳性杂交信号的菌落在含有 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基上进行纯化。抽提 12 个纯化菌落的质粒, 使用 HRPAl 探针, 通过 DNA 印迹法来分析这些质粒的 EcoRI 消化物, 目的是确认与该探针杂交的大约 7.3kb 片段的的存在。使用多种酶进行限制性内切酶分析后, 将 2.7kb 的 SacII 片段和 1.6kb 的 SacII 片段亚克隆到用 SacII 酶切后的 pBlueScript II SK 载体上, 分别产生 pRPA-BCAT135 和 pRPA-BCAT134 载体。将这两个载体进行部分测序 (Genome Express, Grenoble), 结果表明存在 1818bp 的可读框 (SEQ ID No. 6), 推断的多肽序列与野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种的 HrpAl 蛋白 (Fenselau 等人, 1992, 分子植物微生物相互作用, 5: 390-396) 具有 85% 的一致性。

实施例 3

来自 RPA BIOC826、含有 $\Delta hrpAl-C2$ 缺失的菌株的构建

通过将 pRPA-BCAT134 的一个片段和 pRPA-BCAT91 的一个片段 (参照图 1) 克隆到质粒 pJQ200SK (Quandt 和 Hynes, 1993, 基因 (Gene) 127: 15-21) 中来体外构建 $\Delta hrpAl-C2$ 缺失。用 NcoI 打开 pRPA-BCAT91 质粒,

然后用多聚酶 I (Klenow 片段) 在 $25\mu\text{M}$ dNTP 存在下, 30°C 处理 15 分钟。用酚/氯仿/异戊醇进行抽提后, 再用乙醇沉淀。将样品溶解到 $40\mu\text{l}$ 水中, 用 20 单位 XbaI 37°C 处理样品, 接下来再用 20 单位 ApoI 50°C 处理。然后用胶分离出大约 1.2kb 的片段, 并用 Quiex II 试剂盒 (Quiagen) 回收。用同样的方法纯化大约 1.3kb 的 pBCAT134 的 RsaI-SacII 片段。将这两个片段连接到用 SacII 和 XbaI 打开的 pBlueScript II SK 载体中, 产生 pRPA-BCAT139 质粒。然后, 从这个质粒中能够抽提出携带 $\Delta hrpA1-C2$ 缺失的大约 2.5kb 的 SacI-XbaI 片段以便克隆到用 SacI 和 XbaI 酶打开的质粒 pJQ200KS 中。得到的质粒命名为 pRPA-BCAT140。这个质粒在野油菜黄单胞菌中是不能复制的, 它携带的庆大霉素抗性标记可用于选择已经通过同源重组整合了该质粒的野油菜黄单胞菌克隆, 而且它所携带的 sacB 正向选择标记可用于选择发生第二次同源重组事件后去除了庆大霉素抗性标记的克隆。

通过接合将 pRPA-BCAT140 质粒引入到 RPA BIOC826 菌株中。为此, 将 MSX 培养基中含有 pRPA-BCAT140 的 DH5alpha 菌株指数生长期的培养物 $40\mu\text{l}$, 含有 pRK2013 质粒的 HB101 菌株指数生长期的培养物 $40\mu\text{l}$ (Ditta 等人, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 77: 7347-7351) 和指数生长期的 RPA-BIOC826 菌株培养物 $40\mu\text{l}$, 在 MSX 琼脂培养基上混合。 30°C 孵育 24 小时后, 将已经整合了 pRPA-BCAT140 质粒的野油菜黄单胞菌克隆在含有 $15\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素的 MSX 琼脂培养基上连续纯化两次。在约 1 平方厘米的含有 5% 蔗糖的 MSX 琼脂培养基表面平板接种 8 个克隆。 30°C 孵育 72 小时后, 通过在 MSX 琼脂培养基上两次连续的纯化来分离菌落。然后, 为鉴别 45 庆大霉素敏感的克隆(根据此实验 90 到 100% 的克隆), 将大约 300 个菌落在含有 $15\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素的 MSX 琼脂培养基上进行传代培养。然后用 EcoRI-BamHI 消化的其基因组与 HRP1 探针进行 DNA 印迹法来分析大约 40 个这样。大约有 25% 的克隆表现出与野生型 RPA-BIOC826 菌株不同并与 $\Delta hrpA1-C2$ 缺失的整合一致的信号。选择了 5 个克隆用于后面的实验: RPA BIOC826 菌株 1016、1017、1019、1021 和 1022。

实施例 4

来自 RPA-BIOCAT826 并含有 $\Delta hrpA1-C2$ 缺失的菌株的 DNA 印迹法鉴定

通过分析 EcoRI、BamHI 和 EcoRI-BamHI 消化的基因组 DNA 与 HRP3'A1、HRPB5 和 HRPC2 探针的杂交图谱来分析鉴定 RPA BIOCAT 菌株 1016、1017、1019、1021 和 1022。

HRP3'A1 探针是通过将 pRPA-BCAT134 质粒的 1.6kb SacII 片段在琼脂糖凝胶上移动，然后再使用 Qiaex 试剂盒进行纯化而得到的。

HRPC2 探针是通过将 pRPA-BCAT91 质粒的 1.2kb EcoRI-XbaI 片段在琼脂糖凝胶上移动，然后再使用 Qiaex 试剂盒进行纯化而得到的。

HRPB5 探针是通过将 pRPA-BCAT129 质粒的 1.5kb BamHI 片段在琼脂糖凝胶上移动，然后再使用 Qiaex 试剂盒进行纯化而得到的。尤其该插入片段的测序表明有一个可读框 (SEQ ID No. 7)，推断的肽序列与野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种的 HrpB5 蛋白 (Fenselau 等人, 1995, 分子植物微生物相互作用, 8: 845-854) 具有 77% 的一致性。通过将大小在 1.3 至 1.9kb 的 RPA BIOCAT826 菌株的 BamHI 基因组 DNA 片段克隆到 pBlueScript II SK 载体中，并按照实施例 2 中所描述的相似方法用 HRPB 探针筛选菌落来得到 pRPA-BCAT129 质粒。使用引物 RST2 和 RST3 (Leite 等人, 1994, 应用环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.) 60:1068-1077) 与质粒模板 pB10g (U. Bonas, 个人联系) 通过 PCR 来获得 HRPB 探针。质粒 pB10g 相当与其中克隆了含有野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种的 hrpB 区域和 hrpA1 基因的 7.3kb BamHI 片段的 pBlueScript KS 质粒 (Fenselau 等人, 1995, 分子植物微生物相互作用, 8: 845-854)。使用 40pmol 的每一种引物, 50ng pB10g, 0.2mM dNTP 和 1.25U Pwo 聚合酶 (Boehringer Mannheim), 在终体积为 50 μ l 这种酶的缓冲液中进行 PCR 反应。95℃ 孵育 5 分钟后, 混合物首先经过 24 个循环, 每个循环包括 95℃ 孵育 30 秒钟, 然后在温度 70℃-63℃ (每一循环变化 0.3℃) 下 40 秒钟, 以及 72℃ 1 分钟, 接下来的 6 个循环包括 95℃ 孵育 30 秒钟, 63℃ 40 秒钟以及 72℃ 1 分钟, 最后是 72℃ 5 分钟。将

大约 840bp 的扩增产物在琼脂糖凝胶上和使用 Qiaex 试剂盒 (Quiagen) 来进行纯化。

根据提供的说明,使用“Megaprime DNA 标记系统”试剂盒 (Amersham) 标记探针来进行 DNA 印迹法分析。按照所提供的说明,将基因组 DNA 的消化物在琼脂糖凝胶上移动后,转移到 Hybond N+膜 (Amersham) 上,在由 0.5M 磷酸盐缓冲液和 7% SDS (115ml 1M Na_2HPO_4 , 84.6ml [脱漏]M NaH_2PO_4 , 200ml 水和 28 克 SDS) 组成的杂交溶液中孵育。将标记的探针在 100℃ 孵育 5 分钟,再在室温下孵育 5 分钟,然后稀释在 12ml 杂交溶液中,100℃ 孵育 5 分钟。接下来将混合物与膜在 65℃ 接触 6 到 20 个小时,将膜在含有 1% SDS 的 0.1M 磷酸盐缓冲液 (42.3ml 1M Na_2HPO_4 , 57.7ml 1M NaH_2PO_4 , 900ml 水和 10 克 SDS) 中洗涤 10 到 15 分钟后,曝光。

用 HRPB5 探针所得到的结果 (图 2) 表明,对于 RPA-BIOCAT826 菌株,使用 EcoRI 消化的杂交信号在大约 4.8kb,用 BamHI 消化和 EcoRI-BamHI 消化的信号在 1.6kb。这些结果与 Arlat 等人 (分子植物微生物相互作用, 1991, 4: 593-601) 所得到的图谱和以上所描述的 *hrpB5* 基因的定位是一致的。所研究的 RPA-BIOCAT 菌株中没有显示出与 HRPB5 的杂交信号,这与这些 RPA BIOCAT 菌株 1016、1017、1019、1021 和 1022 的基因组中整合了 $\Delta hrpA1-C2$ 缺失是一致的 (图 2 只显示了 RPA-BIOCAT 菌株所得到的杂交结果)。

用 HRPC2 探针所得到的结果 (图 3) 表明,对于 RPA-BIOCAT826 菌株,使用 EcoRI 消化的杂交信号在大约 5.5kb,用 EcoRI-BamHI 消化的信号在 2.6kb。这些结果与 Arlat 等人 (分子植物微生物相互作用, 1991, 4: 593-601) 所得到的图谱,野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种的 *hrp* 基因的组构 (Fenselau 等人, 1992, 分子植物微生物相互作用, 5: 390-396) 和以上所描述的 *hrpB5* 基因的定位是一致的。由 RPA BIOCAT 菌株 1016、1017、1019 和 1021 所得到的结果,使用 EcoRI 消化的杂交信号在 7 到 8kb 之间,用 EcoRI-BamHI 消化的信号在 4.4kb。如图 1 所显示的图谱,这些结果与 RPA BIOCAT 菌株 1016、1017、1019、1021 和 1022 的基因组中整合了 $\Delta hrpA1-C2$ 缺失是一致的。

最后, 用 HRP3'A1 探针所得到的结果表明, 对于 RPA-BIICC826 菌株, 使用 EcoRI-BamHI 消化的杂交信号在 7.3kb。使用 RPA-BIICC826 菌株 1016、1017、1019 和 1021, 该杂交信号在 4.4kb。这与这些菌株基因组中整合了 $\Delta hrpA1-C2$ 缺失是一致的。

实施例 5:

来自 RPA-BIICC826 并含有 $\Delta hrpA1-C2$ 缺失的菌株的毒力

在甘蓝植物 (*Brassica oleracea* var. *captiva* cultivar *Siria*) 上进行毒力试验, 从 Clause Semences (av. Lucien Clause, 91221 Brétigny-sur-Orge, 法国) 获得其种子。根据以下的常规在人工气候室中种植这种植物: 25℃ 14 小时、55%湿度、饱和的光强度 (4000W/m); 25℃ 10 小时, 60%湿度。在两叶阶段进行感染, 例如播种后大约 13 天。对每一种菌株都使用 8 株植物, 在第一片叶子的中脉末端部分使用感染的牙签进行穿刺。通过将牙签的顶部浸入到 MSX 培养基中所研究的菌株的 2 天培养物 (大约 10^8 细菌/ml) 中来使之得到污染。阴性对照包括使胡椒发生植物病害的、在 Clause Semences 分离到的野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种的参考菌株混合物 (B229RI 菌株=RPA-BIICC831, B230RII 菌株=RPA-BIICC832)。阳性对照包括使甘蓝发生植物病害的, 在 Clause Semences 分离到的野油菜黄单胞菌野油菜致病变种的参考菌株混合物 (2963 菌株=RPA-BIICC8379, 63C2AM 菌株=RPA-BIICC8380)。观察症状 (V 形黄色损伤), 并在感染 12 和 14 天后测量。对应以下: 0, 没有症状; 1, 感染点的附近有褪色; 2, 坏死小于 0.5 平方厘米; 3, 坏死在 0.5 到 1.5 平方厘米; 4, 坏死大于 1.5 平方厘米; 5, 叶片的广泛坏死, 对每一株植物进行打分。用同一种菌株感染的 8 株植物的分数总和是该菌株的致病性分数 (表 1)。

表 1: 黄单胞菌属菌株的致植物病性

菌株	+12 天	+14 天
BIOCAT 381/382	0	0
BIOCAT 379/380	32	39
BIOCAT826	28	34
BIOCAT 1016	4	4
BIOCAT 1017	5	5
BIOCAT 1019	2	3
BIOCAT 1021	1	1
BIOCAT 1022	4	5

虽然 RPA-BIOCAT826 菌株能够引起叶片的不断枯萎, 但所构建的菌株至多只能引起局部的坏死干枯, 从而反映出无致病性。

实施例 6

来自 RPA-BIOCAT826 并含有 *hrpA1-C2* 缺失的菌株的黄原胶生产

通过测量可用异丙醇沉淀得到的 40ml 培养物所含固体来评定菌株黄原胶的生产能力。在 MSX 中经过 24 小时预培养后, 在 500ml 三角瓶中放入 100ml MSX 培养基, 用大约同样量的细菌 ($0.4\text{ml OD}_{660}=0.25$ 的预培养物) 进行接种, 30°C 振荡培养 (200 转/分) 6 天后, 取出 40 克培养物与 150ml 异丙醇混合。过滤后, 将所回收的沉淀用 70ml 异丙醇冲洗两次, 干燥, 然后在其离开烤箱之时称重。用 RPA-BIOCAT826 菌株的三个独立的培养物进行此操作, 结果显示出具有大约 10% 的生产能力可变性。使用 RPA-BIOCAT826 菌株和它的 $\Delta hrpA1-C2$ 衍生物所得到的结果如表 2 所示。

表 2: RPA-BIOCAT826 菌株和它的 $\Delta hrpA1-C2$ 衍生物的黄原胶生产能力.

菌株	黄原胶干重 (克)	生产能力 (克 /克)
BIOCAT826	0.323	8.1×10^{-3}
BIOCAT 1016	0.362	9.0×10^{-3}
BIOCAT 1017	0.366	9.1×10^{-3}
BIOCAT 1019	0.371	9.3×10^{-3}
BIOCAT 1021	0.334	8.4×10^{-3}
BIOCAT 1022	0.329	8.2×10^{-3}

生产能力用每克培养物中用异丙醇可抽提到的固体的克数来表示。

序列表

<110> RHODIA CHIMIE

<120> 产生黄原胶的无毒力野油菜黄单胞菌菌株

<130> BFF 99/0315

<140> FR 9907963

<141> 1999-06-22

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400> 1

aaattcgtca agggatgatgc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400> 2

gttccacctg gtcgacaagc

20

<210> 3

<211> 1189

<212> DNA

<213> 野油菜黄单胞菌

<400> 3

```

aaattcgtca agggatgatgc gatcgccggc ctggatgatca ccatgggtcaa catcttggtc 60
ggcatcggtg taggcgtgac ctaccacggc atgagcgagg gcgagggcgc caaccgcttt 120
gcgatcctgt cggtaggcga tgcgatggtg tcgcagatcg cctcgctgct gatctcggtg 180
gcggccggcg tcatgatcac ccgcgtcgcc aacgagaatg aaaccaagat cagctcgctc 240
gggtctgaca tcggccggcca gctcaccagc aacgcacgtg ccttgatggc agcgagtgtg 300
ctgctggcct gctttgcgtt cgtgccggga tttccggcgc tgctgttcct gctgctggca 360
gcggcggtcg gtgcccgggg ctatacgatc tggcgcaagc aacgcgacac cagcggggagc 420
gatcagcccc cactgccatc aaccagccgc aaagggtgcc aaggcgatgc gccgcacatc 480
cgcaagagcg ccccggtatt cgcctcgccc ttgtcgatgc ggctttcgcc gcaactggct 540
gcacggctcg acccggcgct gctggatcag gcgatcgaaa gcgagcggag gcaattggct 600
gagctgctgg gattgccgtt cccggggatc gcgatatggc agagcgaatc cctgcagggc 660
ctgcagtacg aagtgttgat ccacgatgtg ccggaaaccc gcagcgcgtt gagcgatacg 720
gcggacatgc agaaagcgct ggcccaacaa gccatcgcac cgttgcatgc acgcgcgcac 780

```

```

ctgttcgtcg gcatccagga gacgcagtgg atgctggaac aggtggggcgc ggactatccc 840
gggctgggttg cagaggtcaa caaggccatg ccagcccaac gcatcgccga tgtgttcggg 900
cgactgctgg aagaacgcat cccggtgcgc aacatcaaga gcatcctgga gagcctgggtg 960
gtgtgggggac cgaaggaaaa ggatctgctg atgctgaccg agtatgtgcg ctgcgatctc 1020
ggcgcgtatc ttgcgcacac cgcgaccgca ggcaccggac agctgcctgc ggtgatgctc 1080
gaccacgccc tggaacagtt gatccggcag tcgattcgcg ccacaccggc cggcaatttc 1140
ctggcgctgc caccggagca ggccaatcag cttgtcgacc aggtggaaa 1189

```

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400> 4

gatccaacag ctggacaacc

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400> 5

aacggaatct tcgacaggcc

20

<210> 6

<211> 1818

<212> DNA

<213> 野油菜黄单胞菌

<400> 6

```

atggcatacg cctgtcctcc agttcacccg catcgacgcg cgccgttggc cgctgccttg 60
ttgcttggtt tgetgcccgt gctgccgccc catgccaac ccgctgcggg gccgtggcac 120
tcgcgagct tcaaatacgt tgccgaccgc aaggatctca aggaggtgct gcgcgacctg 180
tccgccagcc aatccatcac cacctggatt tcaccggagg tgaccggcac gctcagtggc 240
aaattcgaag cactccgca gaagtttctc gacgatctat cgggcacggt cggttttgtc 300
tggatttacg atggctcggg gtcagaatc tggggcgcg acgagacc aaatgcgacc 360
ttgagtttgg gcgctgcac gacgagtgcg ctgcgcgatg cgcttgcgcg catgcggctg 420
gacgatccgc gctttccggg ccgttatgac gagacagcgc acctggcggg ggtgtcgggc 480
ccgccggggt atgtggatac cgtcgcggcg atcgccaagc aggtcgagca ggtcgcgcgc 540
caacgcgacg ccaccgaagt gcaggtgttt cagctgcatt atgcgcaggc ggccgaccac 600
accacccgca tcggtgggtc agacatccag gtgccgggca tggccagcct gttgcgcaac 660
atatacggcg tgcgtggcgc gccactgcg gcgctgcccg ggccaggcgc gaatttcggg 720
cgtgtgcaac cgatcggcgg tggctcgtcc aataccttcg gcaacagcgg tcagcgccag 780
agtggcggca gcggcattct cggtttgcc cgtcgtggt tcggcgctgg gtcgcgctcc 840
gagcgggtgc cggtcagtcc gccgttgccg ggcagtggca atagcgccaa tgcgcggcgc 900
agcgtgtggc cggagatgag ccaggccaga cgcgatgcgc cgctggcggg ggacgcggc 960
agcggcggtg agctggcatc cgacgcgccg gtgatcgaag ccgacccgcg caccaacggc 1020
attctcattc gcgaccgccc cgagcggatg gccgcctatg gcacgttgat ccagcagctc 1080
gacaaccgtc ccaagctgct gcagatcgat gccaccatca tcgagatccg cgacggcgcc 1140
ctgcaggatc tcggcgtgga ctggcgggtc cacagccggc gtgtggatgt gcagaccggc 1200

```

```

gacgggcgctg gtggccagct tggctacgat ggcagcttga gcggtgcagc agccgcgggt 1260
gcagccgcgc cgttgggcgg gacgttgacc gctgtcctgg gcgatgcagg gcgttacctg 1320
atgacgcgcg tctcggcgct cgagcagacc aacaaggcca agatcgtctc caccgccgag 1380
gtggcgacgc tggacaacgt ggaagcggtg atggaccaca agcaacaggc attcgtgcgt 1440
gtcagcggtt atgcatccgc cgacctctac aacctgtccg cgggtgtatc gctacgcgta 1500
ttgccaaagt tggtgccggg gtcgccaaat ggtcagatgc gcctggatgt gcgtatcgaa 1560
gacgggacgt tgggcgccaa taccgtcgat ggcattcccg tcatcacctc cagcgagatc 1620
accacgcagg ccttcgtcaa cgagggccag agcctgctga tcgccggtta tgcttccgac 1680
accgatcaga cagatctgaa caacgtcccc gggctgtcca ggattccatt ggtcggcaac 1740
ctgttcaagc atcgccagca gagcgggtcg cggttgcagc ggttgttctt gctgaccccc 1800
catatcgtct cgccctga 1818

```

<210> 7

<211> 702

<212> DNA

<213> 野油菜黄单胞菌

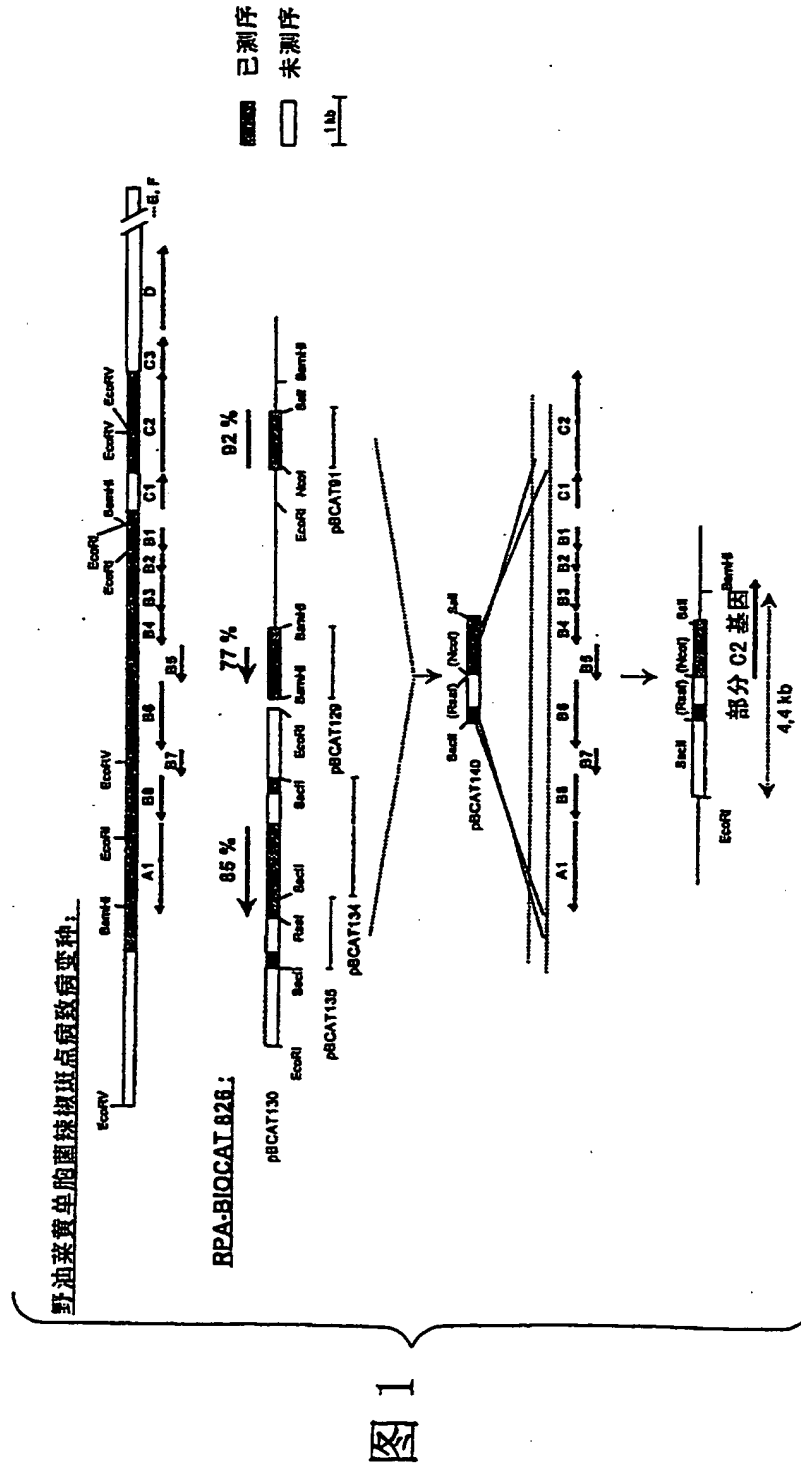
<400> 7

```

atgcgtcttt ggctgaggtc cacaccggaa gcggtcggcc ttgactgcga ggtcatccca 60
cgcgagggcat tggcctgtgt gctggaactg gacgcagcgg gtgcacaggt gcacgcgcgt 120
tgcgcgcagg cgctggcgga cgcccagacg cgtgcgcagg cgctgctcga cgctgcccaa 180
cggcaggccg aggccatcct tcaggatgcc cagcagagg ccgagcgagc tgcacgcctg 240
ggctatgccg cggggctgcg ccgtcagctc gacgcgtgga acgagcgcg cgctgcggcat 300
gccttcgcgg cccaggacgc cgcacggcgc gccgcgagc gcctggccga gatcgtcgcg 360
cacgcctgcg agcaggttct gcacgggcac gatcctgcgg cgctgtacgc gcgcgcgcga 420
caggcgctgg acggcgccct ggacgagggc aacgccctgc aggtgagcgt gcateccgat 480
gcgctggacg atgcacggcg cgccttcgat gcggccgcag cggccggcgg atggagcatg 540
ccggtggaac tgtgcgggtga tacgactctg gccttgggtg cctgcgtgtg cgaatgggat 600
accggcggtg tcgagaccga tctgcgtgat cagctgcgca gtctccggcg cgtcattcgc 660
cgcgtgttgg ccacgcccga ggcggtgccg gatgcttgct ga 702

```

说明书附图



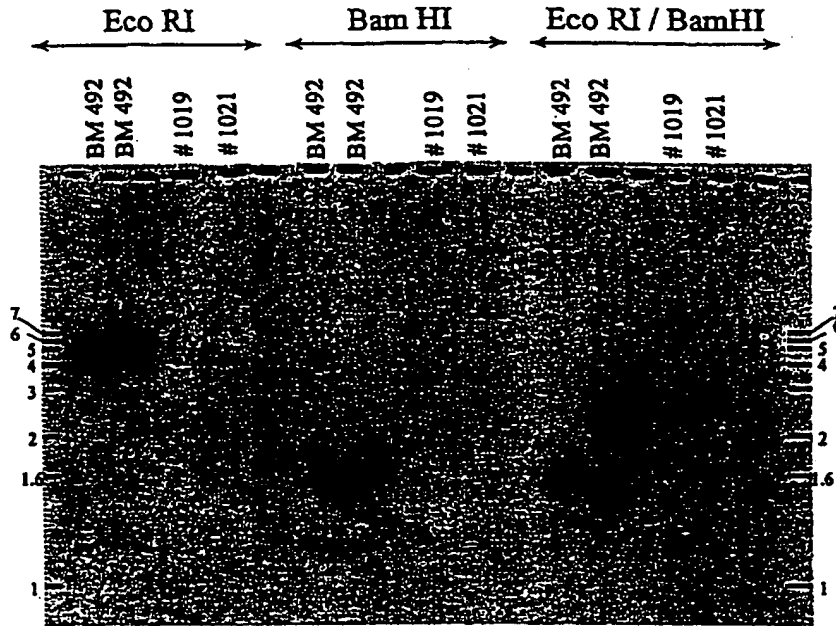


图 2

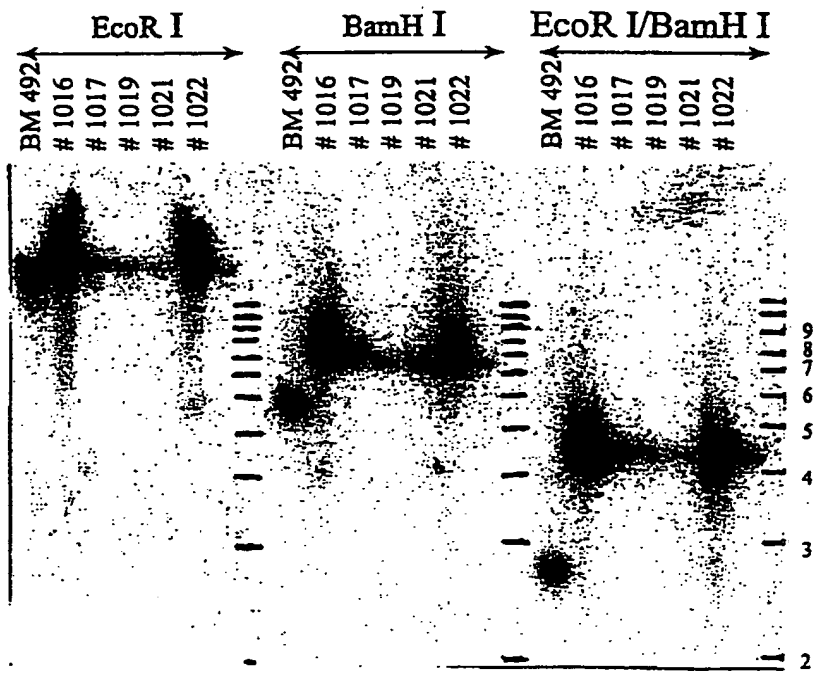


图 3